

小叶莲中 graphislactone A 的分离制备及其抗肿瘤作用机制研究

高美玲^{1,2}, 孙彦君^{1,2*}, 冯卫生^{1,2}, 付露^{1,2}, 关延彬^{1,2}, 张艳丽^{1,2}, 弓建红^{1,2}, 陈辉^{1,2}, 李晓坤^{1,2}, 王彦志^{1,2*}

1. 河南中医药大学 呼吸疾病诊疗与新药研发河南省协同创新中心, 河南 郑州 450046

2. 河南中医药大学药学院, 河南 郑州 450046

摘要:目的 确定小叶莲中 graphislactone A 的制备分离方法; 探讨 graphislactone A 诱导人乳腺癌多药耐药细胞 MCF-7/ADR 凋亡的作用机制。方法 小叶莲药材采用醋酸乙酯超声提取, 提取物经过硅胶柱色谱法富集目标成分, 再用重结晶法纯化。采用 MTT 法检测 graphislactone A 对乳腺癌细胞 MCF-7 和乳腺癌多药耐药细胞 MCF-7/ADR 的细胞毒活性。采用流式细胞术、RT-PCR 技术和 Western blotting 法分别检测 graphislactone A 对乳腺癌多药耐药细胞 MCF-7/ADR 凋亡、凋亡相关基因及 P-糖蛋白 (P-gp) 蛋白表达的影响。结果 建立了小叶莲中 graphislactone A 的制备分离方法。Graphislactone A 对乳腺癌细胞 MCF-7 和乳腺癌多药耐药细胞 MCF-7/ADR 具有细胞毒活性, IC₅₀ 值分别为 2.38、9.35 $\mu\text{mol/L}$, 且能够上调乳腺癌多药耐药细胞 MCF-7/ADR 中 p53、bax、caspase-3 基因的表达, 下调 bcl-2 基因和 P-gp 的蛋白表达。结论 Graphislactone A 为首次从高等植物中发现的酚类化合物, 该制备分离方法效率高、样品回收率高, 得到的目标成分纯度高。与阳性药依托泊苷相比, Graphislactone A 对乳腺癌细胞 MCF-7 和乳腺癌多药耐药细胞 MCF-7/ADR 具有较强的细胞毒活性, 且能够诱导其凋亡, 其机制可能与 p53 的表达水平上调、激活 caspase-3 通路、调节 bax 和 bcl-2 的相对比例, 下调 P-gp 的蛋白表达有关。

关键词: 小叶莲; graphislactone A; 分离制备; 细胞毒活性; 多药耐药; 乳腺癌; 细胞凋亡

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)01-0167-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.01.023

Preparative isolation of graphislactone A from the fruits of *Sinopodophyllum hexandrum* and its antitumor action mechanism

GAO Mei-ling^{1,2}, SUN Yan-jun^{1,2}, FENG Wei-sheng^{1,2}, FU Lu^{1,2}, GUAN Yan-bin^{1,2}, ZHANG Yan-li^{1,2}, GONG Jian-hong^{1,2}, CHEN Hui^{1,2}, LI Xiao-kun^{1,2}, WANG Yan-zhi^{1,2}

1. Collaborative Innovation Center for Respiratory Disease Diagnosis and Treatment & Chinese Medicine Development of Henan Province, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China

2. School of Pharmacy, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China

Abstract: Objective To establish the preparative isolation technique of graphislactone A from the fruits of *Sinopodophyllum hexandrum*, and to investigate the action mechanism for apoptosis induction of graphislactone A in MCF-7/ADR cell line (human breast adenocarcinoma cell line). **Methods** The fruits of *S. hexandrum* were extracted under ultrasound by EtOAc. Graphislactone A was enriched by silica gel column chromatography, and then purified by recrystallization. The cytotoxic activities of graphislactone A were tested against MCF-7 and MCF-7/ADR cell lines by MTT. The apoptosis of MCF-7/ADR cell line was evaluated by flow cytometry. RT-PCR was used to detect the expression of apoptosis-related genes in MCF-7/ADR cell line. Expression of P-gp in MCF-7/ADR cell line was investigated by western blotting. **Results** Graphislactone A was isolated from the fruits of *S. hexandrum*, which showed the potent cytotoxic activities against MCF-7 and MCF-7/ADR cell lines, with IC₅₀ values of 2.38 and 9.35 $\mu\text{mol/L}$, respectively. With the increased dose of graphislactone A, the expression levels of p53, bax, caspase-3 genes were up-regulated, while bcl-2 and P-gp down-regulated in MCF-7/ADR cell line. **Conclusion** Graphislactone A as phenolic compounds was firstly found in

收稿日期: 2017-08-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31300284); 河南中医药大学省属高校基本科研业务专项资金项目 (2014KYYWF-QN26); 河南省高等学校青年骨干教师资助计划 (2015GGJS-096); 河南中医药大学科技创新人才支持计划 (2016XCXRC01)

作者简介: 高美玲 (1990—), 女, 在读研究生, 主要从事天然抗肿瘤活性物质研究。E-mail: gaomiaomei6266@126.com

***通信作者** 孙彦君, 副教授, 硕士生导师, 主要从事中药药效物质基础研究。Tel: (0371)65962746 E-mail: sunyanjunily@126.com
王彦志, 教授, 硕士生导师。E-mail: wangyzlb@126.com

higher plants. The preparative isolation has the advantages of high-efficiency, high sample recovery, and high-purity compared with etoposide. Graphislactone A showed strong cytotoxic activities and apoptosis induction action in MCF-7 and MCF-7/ADR cell line.

Key words: fruits of *Sinopodophyllum hexandrum* (Royle) Ying; graphislactone A; isolation and preparation; cytotoxic activities; multidrug resistance; breast cancer; cell apoptosis

乳腺癌已经成为严重威胁中青年妇女健康和生命的主要疾病之一, 发病率较高, 全国每年新发乳腺癌的人数约 100 万以上。据统计, 癌症死亡患者中有 90% 以上存在着耐药这一现象, 肿瘤耐药是当今肿瘤治疗的一大难题, 尤其是多药耐药性的产生, 使肿瘤的治愈率仍很低^[1]。在癌症化疗药物中约 50% 是直接来源于天然产物或其衍生物^[2]。因此, 可以从传统的中药中寻找高效低毒的先导化合物来应对多药耐药性乳腺癌。

小叶莲是小檗科桃儿七属植物桃儿七 *Sinopodophyllum hexandrum* (Royle) Ying 的干燥成熟果实。作为传统藏药, 记载于《神农本草经》《晶珠本草》《月王药诊》等本草著作中, 具有活血调经的功效, 常用于闭经、痛经、血瘀、难产、胎死腹中、胎盘不下等妇科病症^[3]。Graphislactone A 是一种酚类化合物, 对人结肠癌细胞 SW1116 具有细胞毒活性, IC₅₀ 值为 8.5 μg/mL^[4], 同时还具有抗菌^[5]、抗氧化、清除自由基^[6]、抑制乙酰胆碱酯酶^[7]等作用。截止目前, 该化合物仅在地衣和微生物中被发现, 其提取分离操作过程复杂, 耗时长^[4-10]。本课题组从小叶莲中分离制备 graphislactone A, 观察其对乳腺癌细胞 MCF-7 和乳腺癌多药耐药细胞 MCF-7/ADR 的细胞毒活性, 并探讨其对乳腺癌多药耐药细胞 MCF-7/ADR 诱导凋亡的作用机制。

1 材料

1.1 试剂与仪器

薄层色谱 GF₂₅₄、柱色谱硅胶 (200~300 目, 青岛海洋化工厂); 实验所用试剂规格均为分析纯; 二甲基亚砜 (DMSO, 天津四友精细化学品有限公司); RPMI 1640 培养基和胎牛血清 (美国 Gibco 公司); 细胞凋亡检测试剂盒 (南京诺唯赞生物科技有限公司); RT-PCR 试剂盒 (大连 TaKaRa 公司); 兔抗 P-糖蛋白 (P-gp) 单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的小鼠抗兔二抗 (北京博奥森生物技术有限公司); CO₂ 培养箱 (德国 Heraeus 公司); SW-CJ 超净工作台 (上海锦屏仪器仪表有限公司); Model 680 酶标仪 (美国 Biorad 公司); XD-101 倒置显微镜 (南京江南光电有限公司); B1-220A 生物显微

镜 (麦克奥迪实业集团有限公司); AR1140 电子分析天平 [梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司]。

1.2 药材与药品

小叶莲药材于 2013 年采集自云南省德钦县, 经河南中医药大学药学教研室董诚明教授鉴定为小檗科桃儿七属植物桃儿七 *Sinopodophyllum hexandrum* (Royle) Ying 的干燥成熟果实; 依托泊苷 (齐鲁制药有限公司, 批号 B1K1512008); 阿霉素 (山西普德药业股份有限公司, 批号 02140701)。

1.3 细胞

人乳腺癌细胞株 MCF-7 和人乳腺癌多药耐药细胞株 MCF-7/ADR 由中国医学科学院药物研究所提供。

2 方法

2.1 graphislactone A 的分离制备

2.1.1 粗提取物的制备 小叶莲药材 5 kg 粉碎, 过 40 目筛, 每次用小叶莲质量 10 倍量的醋酸乙酯超声提取 3 次, 提取时间分别为 1.0、0.5、0.5 h, 提取温度为 45 °C, 合并醋酸乙酯提取液, 减压浓缩, 即得小叶莲粗提取物 (78 g)。

2.1.2 硅胶柱色谱初步分离 小叶莲粗提取物经硅胶柱色谱 (70 cm×6 cm) 分离, 分别采用体积比为 100:10、100:20 的石油醚-丙酮系统进行梯度洗脱, 每一梯度用 2 L 洗脱液, 体积流量为 4 mL/min, 收集石油醚-丙酮体积比为 100:20 洗脱流分, 45 °C 减压浓缩, 加丙酮超声溶解, 滤过后的滤液放置 15 h, 产生无色方晶, 该晶体经丙酮重结晶, 即得 graphislactone A (62 mg, 质量分数 99.3%)。

2.2 MTT 法检测细胞增殖

MCF-7 细胞培养于含有 10% 经加热灭活的胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素的 RPMI 1640 培养基中, 将培养瓶置于 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度培养箱培养, 每 1~2 天换培养液 1 次。当细胞生长到足以覆盖瓶底壁的大部分表面时, 用 0.25% 胰蛋白酶消化, 传代。MCF-7/ADR 细胞在含 1.0 μg/mL 阿霉素的 RPMI 1640 培养基中连续传代培养, 实验前 2 周换为无阿霉素的 RPMI 1640 培养基培养。

对数生长期细胞培养于 96 孔培养板内, 每孔

100 μL (含 4 000 个肿瘤细胞), 置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养。次日, 给药组加入含有不同浓度的 graphislactone A 的稀释液, 每种细胞设 6 个浓度 (40、20、10、5、2.5、1.25 $\mu\text{mol/L}$) 组, 每组至少设 3 个平行孔; 对照组加入与给药组等体积的溶剂。置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养。2 d 后弃培养液, 每孔加 50 μL (1 mg/mL) MTT 溶液 (培养基配制), 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 4 h, 弃去上清液, 每孔加入 DMSO 200 μL , 轻度振荡溶解。用酶标仪, 在检测波长 490 nm 条件下测定吸光度 (A) 值, 以溶剂对照处理的细胞为对照组, 计算药物对细胞的增殖抑制率, 根据计算得到的各浓度的增殖抑制率通过 SPSS 18.0 软件处理得到半数抑制浓度 (IC_{50}), 重复测试 3 次, 取平均值为最终结果。

$$\text{增殖抑制率} = (A_{\text{对照}} - A_{\text{药物}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.3 流式细胞术检测细胞凋亡

取对数生长期 MCF-7/ADR 细胞, 弃去培养液, 2 mL PBS 洗 2 次后, 加入胰酶-EDTA 1 mL 消化 3 min, 用 2 mL 细胞完全培养基终止消化 (悬浮细胞直接吹打分散均匀), 用吸管轻轻吹打使消化细胞均匀分散悬浮, 将细胞悬液移入 5 mL 离心管中, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液。加入适量细胞冻存培养液重悬沉淀细胞, 细胞单层接种在 6 孔板中, 细胞数为 5×10^5 个, 培养过夜后, 以不同浓度 (1、5、10 $\mu\text{mol/L}$) 的 graphislactone A 作用于 MCF-7/ADR 细胞, 设 3 个平行, 同时设对照组 (培养基), 培养 48 h 后, 无 EDTA 胰酶消化, 收集细胞, 1 500 r/min 离心 5 min, PBS 洗 1 次, 用预冷的 75%乙醇 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定过夜。用冷 PBS 洗涤细胞 1 次。用 200~500 μL 冷 PBS 重悬细胞。加入 20 μL RNase A Solution, 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min。400 目筛网滤过。加入 400 μL PI 染液, 轻轻混匀后 4 $^{\circ}\text{C}$, 避光孵育 30~60 min。流式细胞仪检测, 在激发波长 488 nm 处检测, 同时检测光散射情况。采用适当分析软件进行细胞 DNA 含量分析和光散射分析。

2.4 RT-PCR 法检测凋亡相关基因表达

以不同浓度 (0、1、5、10 $\mu\text{mol/L}$) graphislactone A 作用于 MCF-7/ADR 细胞 24 h 后, 取培养的 MCF-7/ADR 细胞, 采用 Trizol 试剂盒常规提取细胞总 RNA, 并检测 RNA 的纯度和完整性。cDNA 的合成按照逆转录试剂盒说明书进行。PCR 的反应程序: β -actin 条件选择为 94 $^{\circ}\text{C}$ 、3 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min, 57 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min, 30 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 、

5 min; P53 条件选择为 94 $^{\circ}\text{C}$ 、3 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min, 57 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 、5 min, 28 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 、10 min; bcl-2 条件选择为 94 $^{\circ}\text{C}$ 、3 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min, 57 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min, 30 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 、5 min; bax 条件选择为 94 $^{\circ}\text{C}$ 、3 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min, 57 $^{\circ}\text{C}$ 、45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 、3 min, 30 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 、5 min; caspase-3 条件选择为 94 $^{\circ}\text{C}$ 、3 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 、45 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 、45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 、45 s, 30 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 、5 min。选用 β -actin 的 mRNA 扩增为内参照。

2.5 Western blotting 法检测 P-gp 蛋白的表达

取不同浓度 (0、1、5、10 $\mu\text{mol/L}$) graphislactone A 作用于 MCF-7/ADR 细胞, 24 h 后收集细胞及培养基, 离心后得到细胞沉淀, 弃去上清, 用冰 PBS 清洗 2 次, 加入细胞裂解液, 冰上裂解 30 min (每 8 分钟重悬混匀 1 次), 12 000 r/min 离心 20 min, 取上清, BCA 法定量总蛋白, SDS-PAGE 电泳蛋白样品后, 转膜, 蛋白封闭后, 封一抗过夜, 二抗 2 h 后曝光显影。

2.6 统计学分析

所有数据采用 SPSS 18.0 统计分析软件进行分析, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 graphislactone A 结构鉴定

无色方晶 (甲醇), 熔点 236~237 $^{\circ}\text{C}$ 。在紫外灯 254 nm 下呈暗斑, 10%硫酸乙醇不显色。三氯化铁-铁氰化钾试剂显阳性, 表明结构中含有酚羟基。HR-ESI-MS 给出准分子离子峰 m/z 303.087 2 [$\text{M} + \text{H}$] $^{+}$ (计算值 303.086 9), 确定分子式为 $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_6$, 不饱和度为 10。 ^1H -NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) 显示 2 个甲氧基质子信号 δ 3.89 (3H, s)、3.90 (3H, s); 1 个与烯碳相连的甲基质子信号 δ 2.69 (3H, s); 苯环上 3 个氢质子信号 δ 6.60 (1H, d, $J = 2.0$ Hz), 7.20 (1H, d, $J = 2.0$ Hz), 6.91 (1H, s); 2 个酚羟基质子信号 δ 11.85 (1H, s), 9.20 (1H, s)。 ^{13}C -NMR (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) 显示 16 个碳信号, 除了 2 个甲氧基碳信号 δ 55.7、55.9 和 1 个与烯碳相连的甲基碳信号 δ 24.6 之外, 还包括 12 个芳香碳信号和 1 个内酯羰基碳信号 δ 164.4。由苯环上氢质子 δ 7.20 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-10) 与 δ 132.2 (C-10a)、98.4 (C-6a)、110.4 (C-10b) 的 HMBC 相关, 表明 2 个苯环通过碳-碳键连接。由该化合物的不饱和度为 10, 其中 2 个苯环 (8 个不饱和度)、1 个内酯羰基 (1 个不饱和度)、推测结构中还有应存在 1 个环。由 2 个甲氧基 δ 3.89 (3H, s)、3.90 (3H, s) 与 δ 148.1

(C-3)、165.9 (C-9) 的 HMBC 相关, 表明 2 个甲氧基分别与 3 位和 9 位碳相连。由甲基质子 δ 2.69 (3H, s) 与 δ 126.1 (C-1) 的 HMBC 相关, 表明甲基与 1 位碳相连。将该化合物的 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 信号通过 HSQC、HMBC 谱进行归属 (表 1)。与文献报道^[10] 中 graphislactone A 的氢谱和碳谱数据对照基本一致, 确定该化合物为 graphislactone A。

3.2 对 MCF-7 和 MCF-7/ADR 细胞的细胞毒性

从表 2 可以看出, graphislactone A 对乳腺癌细胞 MCF-7 和乳腺癌多药耐药细胞 MCF-7/ADR 具有

表 1 graphislactone A 的核磁数据归属 (500 MHz, DMSO- d_6)
Table 1 NMR (500 MHz, DMSO- d_6) assignments of graphislactone A

位置	δ_{C}	δ_{H}
1	126.1 s	
2	112.9 d	6.91 (1H, s)
3	148.1 s	
4	140.5 s	
4a	137.9 s	
6	164.4 s	
6a	98.4 s	
7	164.4 s	
8	99.4 d	6.60 (1H, d, $J = 2.0$ Hz)
9	165.9 s	
10	103.7 d	7.20 (1H, d, $J = 2.0$ Hz)
10a	132.2 s	
10b	110.4 s	
11	24.6 q	2.69 (3H, s)
3-OCH ₃	55.9 q	3.89 (3H, s)
9-OCH ₃	55.7 q	3.90 (3H, s)
4-OH		9.20 (1H, s)
7-OH		11.85 (1H, s)

表 2 Graphislactone A 对 MCF-7 和 MCF-7/ADR 细胞的细胞毒性 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 2 Cytotoxic activities of graphislactone A in MCF-7 and MCF-7/ADR cell line ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

样品	$\text{IC}_{50}/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$		耐药 倍数
	MCF-7	MCF-7/ADR	
graphislactone A	2.38 ± 0.19	9.35 ± 0.61	3.93
依托泊苷	3.17 ± 0.25	32.99 ± 3.07	10.41

较强的细胞毒性, IC_{50} 值分别为 2.38、9.35 $\mu\text{mol/L}$, 且远远强于阳性对照药依托泊苷。Graphislactone A 对肿瘤细胞与正常细胞具有良好的选择性, 对人血管内皮细胞 (HVEC) 的细胞毒活性的 IC_{50} 值大于 100 $\mu\text{mol/L}$, 无显著毒性 (本课题组研究结果)。乳腺癌多药耐药细胞 MCF-7/ADR 对依托泊苷、graphislactone A 的耐药倍数分别为 10.41、3.93。由此可见, graphislactone A 能够有效克服乳腺癌多药耐药细胞的耐药性, 且对多药耐药细胞 MCF-7/ADR 的杀伤作用明显高于临床广泛应用的依托泊苷。

3.3 对 MCF-7/ADR 细胞凋亡的影响

Graphislactone A 作用 MCF-7/ADR 48 h 后, 其细胞凋亡现象比较明显, 见图 1。经 1 $\mu\text{mol/L}$ 的 graphislactone A 作用 48 h 后, MCF-7/ADR 细胞凋亡 (早期凋亡和晚期凋亡) 率为 15.95%。随着药物浓度的增加, MCF-7/ADR 细胞凋亡率由 15.95% 上升至 30.29%, 呈现一定的浓度依赖性。

3.4 对 MCF-7/ADR 细胞凋亡相关基因表达的影响

不同浓度的 graphislactone A (1、5、10 $\mu\text{mol/L}$) 作用于乳腺癌多药耐药细胞 MCF-7/ADR 24 h 后, 细胞中 p53、bax、caspase-3 基因的表达上调, 且随着药物浓度的增加, 上调作用增强; 细胞中 bcl-2 基因的表达下调, 且随着药物浓度的增加, 下调作用增强, 具体结果见表 3 和图 2。

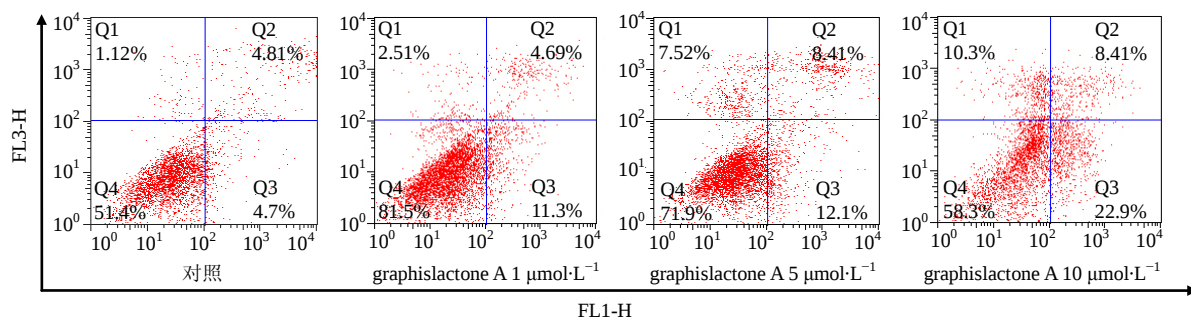


图 1 Graphislactone A 对 MCF-7/ADR 细胞凋亡的影响

Fig. 1 Effect of graphislactone A on apoptosis in MCF-7/ADR cell line

表 3 Graphis lactone A 对 MCF-7/ADR 细胞 p53、bcl-2、bax、caspase-3 基因和 P-gp 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 3 Effect of graphis lactone A on expression of p53, bcl-2, bax, caspase-3 gene, and P-gp protein in MCF-7/ADR cell line ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	C/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	基因相对表达量/%				(P-gp/GAPDH)/%
		p53/ β -actin	bcl-2/ β -actin	bax/ β -actin	caspase-3/ β -actin	
对照	—	13.57 $\pm$ 1.12	39.57 $\pm$ 3.02	11.35 $\pm$ 1.06	8.74 $\pm$ 0.65	98.06 $\pm$ 7.61
graphis lactone A	1	17.26 $\pm$ 1.49**	33.84 $\pm$ 2.06**	17.40 $\pm$ 1.53**	14.88 $\pm$ 1.07**	44.91 $\pm$ 3.50**
	5	36.15 $\pm$ 2.04**	20.19 $\pm$ 1.85**	25.81 $\pm$ 2.39**	33.75 $\pm$ 2.30**	31.42 $\pm$ 2.87**
	10	39.10 $\pm$ 2.83**	17.36 $\pm$ 0.93**	38.72 $\pm$ 3.25**	40.61 $\pm$ 3.92**	16.39 $\pm$ 1.33**

与对照组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group

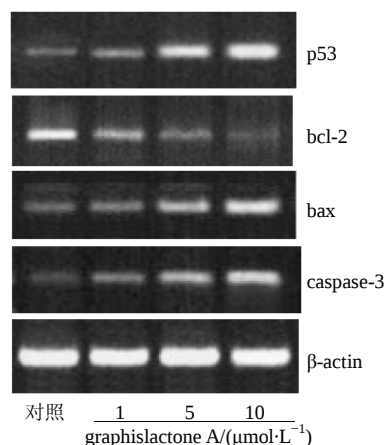


图 2 Graphis lactone A 对 MCF-7/ADR 细胞中凋亡相关基因 p53、bcl-2、bax、caspase-3 表达的影响

Fig. 2 Effect of graphis lactone A on expression of apoptosis-related genes p53, bcl-2, bax, and caspase-3 in MCF-7/ADR cell line

3.5 对 P-gp 蛋白表达的影响

不同浓度的 graphis lactone A (1、5、10 $\mu\text{mol/L}$) 作用于乳腺癌多药耐药细胞 MCF-7/ADR 24 h 后, graphis lactone A 有降低 P-gp 蛋白表达水平的趋势 (表 3 和图 3), 说明 graphis lactone A 可能通过抑制 P-gp 蛋白表达来逆转乳腺癌多药耐药细胞 MCF-7/ADR 的多药耐药。

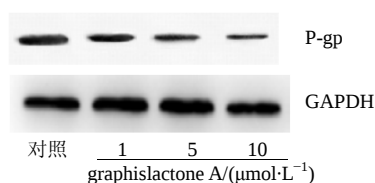


图 3 Graphis lactone A 对 MCF-7/ADR 细胞 P-gp 蛋白表达的影响

Fig. 3 Effect of graphis lactone A on protein expression of P-gp in MCF-7/ADR cell line

4 讨论

机体细胞在发育过程中或在某些因素作用下, 通过细胞内基因及其产物的调控而发生的一种程序性细胞死亡称之为细胞凋亡。多数化疗药物是通过诱导细胞凋亡来杀死肿瘤细胞的, 肿瘤细胞多药耐药也是通过抵抗和逃逸凋亡机制而产生的。随着对肿瘤耐药机制研究的逐渐深入, 有些凋亡基因如 p53、bcl-2、bax、caspase-3 等被发现与肿瘤耐药密切相关^[11]。

肿瘤抑制基因 p53 可以通过激活凋亡通路, 从而诱导细胞发生凋亡。一方面, 激活 fas 介导的死亡受体途径, 引起 caspase-3 的表达水平上调; 另一方面, 激活 bcl-2 介导的线粒体途径, 使 bax 的表达水平升高, 以及使 bcl-2 的表达水平下降^[12]。

本实验测试结果表明, 不同浓度的 graphis lactone A (1、5、10 $\mu\text{mol/L}$) 作用于乳腺癌多药耐药细胞 MCF-7/ADR 24 h 后, 可诱导 p53 基因的表达, 从而促进乳腺癌多药耐药细胞 MCF-7/ADR 的凋亡。

细胞对凋亡刺激因素的敏感性主要取决于细胞内 bcl-2/bax 的值。正常组织内 bcl-2/bax 的值是维持恒定的, 使细胞的增殖与凋亡保持平衡, 当 bcl-2/bax 值增加时, 细胞凋亡过程受到抑制, 细胞过度增生, 从而产生肿瘤。bcl-2 基因属于原癌基因, 是目前公认的抗凋亡基因, 可阻断多种原因导致的细胞凋亡过程。乳腺癌细胞对有些化疗药物 (如阿糖胞苷、阿霉素、环磷酰胺、喜树碱、长春新碱等) 产生耐药性, 与 bcl-2 基因高表达密切相关。bax 是凋亡促进基因的代表, bax 过度表达可诱导多种肿瘤细胞产生凋亡^[13]。本实验测试结果表明, graphis lactone A 可以下调 bcl-2 mRNA 的表达, 同时上调了 bax mRNA 的表达, 因此 bcl-2 基因家族

在 graphislactone A 诱导乳腺癌多药耐药细胞 MCF-7/ADR 凋亡中起着重要的调控作用。

作为线粒体途径和死亡受体途径最终共同通路, caspase-3 的激活与过度表达均引起细胞凋亡。在已发现的 14 个家族成员中, caspase-3 处于凋亡有序级联反应的下游, 是多种凋亡刺激信号传递的汇聚点^[14]。本实验测试研究结果表明, 不同浓度的 graphislactone A (1、5、10 $\mu\text{mol/L}$) 对乳腺癌多药耐药细胞 MCF-7/ADR 作用 24 h 后, 可以增加 caspase-3 mRNA 表达水平, 说明 graphislactone A 能够通过促进 caspase-3 mRNA 表达, 诱导多药耐药细胞 MCF-7/ADR 凋亡而发挥抗肿瘤多药耐药作用。

肿瘤耐药分为多药耐药和原药耐药 2 种类型。肿瘤多药耐药是肿瘤细胞免受药物攻击的重要的细胞防御机制, 是指肿瘤细胞对一种化疗药物耐药的同时也对与其结构无关、作用机制不同的其他药物产生交叉耐药的现象。肿瘤细胞的多药耐药是多因素共同作用的结果, 其中 P-gp 介导的多药耐药是经典的耐药途径, P-gp 是一种 ATP 依赖性的跨膜外流泵, 可将细胞内化疗药物排出细胞, 使肿瘤细胞内化疗药物的蓄积浓度降低而不能有效杀死肿瘤细胞, 从而导致肿瘤细胞耐药^[11]。Graphislactone A 有降低 P-gp 蛋白表达水平的趋势, 说明 graphislactone A 可能通过抑制 P-gp 蛋白表达来逆转乳腺癌多药耐药细胞 MCF-7/ADR 的多药耐药。

小叶莲药材中主要含有芳基萜内酯型木脂素类化合物和黄酮类化合物, 这 2 类成分也是小叶莲发挥抗肿瘤作用的药效物质基础^[15]。Graphislactone A 为首次从高等植物中发现的酚类化合物。本研究建立了小叶莲中 graphislactone A 的快速制备方法, 并探讨其对乳腺癌细胞 MCF-7 和乳腺癌多药耐药细胞 MCF-7/ADR 的细胞毒活性。Graphislactone A 诱导乳腺癌多药耐药细胞 MCF-7/ADR 发生凋亡, 这可能与 p53 的表达水平上调、激活 caspase-3 通路、调节 bax 和 bcl-2 的相对比例, 下调 P-gp 的表达有关。

参考文献

- [1] Alamolhodaei N S, Tsatsakis A M, Ramezani M, et al. Resveratrol as MDR reversion molecule in breast cancer: An overview [J]. *Food Chem Toxicol*, 2017, 103: 223-232.
- [2] Newman D J, Cragg G M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010 [J]. *J Nat Prod*, 2012, 75(3): 311-335.
- [3] 孙彦君, 周巍, 陈虹, 等. 桃儿七中酚类成分研究 [J]. 中草药, 2012, 43(2): 226-229.
- [4] Zhang H W, Huang W Y, Song Y C, et al. Four 6H-dibenzo [b, d] pyran-6-one derivatives produced by the endophyte *Cephalosporium acremonium* IFB-E007 [J]. *Helv Chim Acta*, 2005, 88(11): 2861-2864.
- [5] 黄午阳. 植物内生真菌的抗菌活性研究 [J]. 南京中医药大学学报, 2005, 21(1): 24-26.
- [6] Song Y C, Huang W Y, Sun C, et al. Characterization of graphislactone A as the antioxidant and free radical-scavenging substance from the culture of *Cephalosporium* sp. IFB-E001, an endophytic fungus in *Trachelospermum jasminoides* [J]. *Biol Pharm Bull*, 2005, 28(3): 506-509.
- [7] Hormazabal E, Schmeda-Hirschmann G, Astudillo L, et al. Metabolites from *Microspheeropsis olivacea*, an endophytic fungus of *Pilgerodendron uviferum* [J]. *Z Naturforsch C*, 2005, 60(1/2): 11-21.
- [8] Tanahashi T, Takenaka Y, Nagakura N, et al. 6H-dibenzo [b, d] pyran-6-one derivatives from the cultured lichen mycobionts of *Graphis* spp. and their biosynthetic origin [J]. *Phytochemistry*, 2003, 62(1): 71-75.
- [9] Lai D W, Wang A, Cao Y, et al. Bioactive dibenzo- α -pyrone derivatives from the endophytic fungus *Rhizopycnis vagum* Nitaf22 [J]. *J Nat Prod*, 2016, 79(8): 2022-2031.
- [10] Tanahashi T, Kuroishi M, Kuwahara A, et al. Four phenolics from the cultured lichen mycobiont of *Graphis scripta* var. *pulverulenta* [J]. *Chem Pharm Bull*, 1997, 45(7): 1183-1185.
- [11] 张元. 鬼臼毒素衍生物 CIP-36 抗肿瘤多药耐药作用机制研究 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2010.
- [12] Dong Y, Cao A, Shi J, et al. Tangeretin, a citrus polymethoxyflavonoid, induces apoptosis of human gastric cancer AGS cells through extrinsic and intrinsic signaling pathways [J]. *Oncol Rep*, 2014, 31(4): 1788-1794.
- [13] Wang Y Y, Yang Y X, Zhao R, et al. Bardoxolone methyl induces apoptosis and autophagy and inhibits epithelial-to-mesenchymal transition and stemness in esophageal squamous cancer cells [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2015, 9: 993-1026.
- [14] Li Y H, Wang C, Meng K, et al. Influence of survivin and caspase-3 on cell apoptosis and prognosis in gastric carcinoma [J]. *World J Gastroentero*, 2004, 10(13): 1984-1988.
- [15] Sun Y J, Hao Z Y, Si J G, et al. Prenylated flavonoids from the fruits of *Sinopodophyllum emodi* and their cytotoxic activities [J]. *RSC Adv*, 2015, 5(101): 582736-582742.